

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-173052

(43)Date of publication of application : 08.07.1997

---

(51)Int.Cl. C12N 1/14  
C12N 1/14

---

(21)Application number : 08-076450 (71)Applicant : NISSHIN FLOUR MILLING CO  
LTD

(22)Date of filing : 29.03.1996 (72)Inventor : YAMADA HIDEAKI  
MIYAZAKI EIJI  
OSADA SADA0  
KANZAKI TAKESHI  
OKADA KENZO  
KISHI KEIICHI

---

(30)Priority

Priority number : 07175709 Priority date : 12.07.1995 Priority country : JP  
07278757 26.10.1995 JP

---

## (54) PRODUCTION OF CULTURE MEDIUM MATERIAL FOR PERMENTATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a culture medium material for fermentation for production of enzymes and antibiotics by adding water to a material composed of wheat bran or its mixture with wheat flour or further with a specific quantity of gluten to adjust the moisture content of the mixture, granulating the mixture, and steam-heating the granules.

SOLUTION: This method for easily producing culture medium material for fermentation to be used for producing physiologically active substances such as industrial enzymes and antibiotics, amino acids, etc., comprises adding water to such a material as wheat bran or its mixture with wheat flour having ash content of 1-4wt.%, or further with gluten at 0-40wt.% (based on the mixture) in a pellet mill to adjust the moisture content to the range of 12-18wt.%, pelletizing the mixture to cylindrical pellets of around 4mm in diameter, heating the pellets with saturated steam of 1kg/cm<sup>2</sup> in gauge pressure for 10min, then drying the pellets to reduce the moisture content of the pellets to 15wt.% or

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]Therefore, a charge can be made to increase, without this invention being excellent in the productivity of a fermentation product, and reducing the yield, And it aims at providing the medium raw material which can prepare soluble starch easily and also can prepare the culture medium for fermentation which can separate and refine a fermentation product by easy operation out of a culture medium.

[0006]

[Means for Solving the Problem]Then, this invention person completed this invention, as a result of inquiring not solving an aforementioned problem wholeheartedly.

[0007]This invention Namely, a mixture of wheat bran or wheat bran, and wheat flour, Or water is added to a raw material which added 0 to 40% of the weight of gluten to these, water content at the time of a granulation is adjusted to 12 to 18% of the weight of a range, and is corned, and the 1st invention that subsequently carries out steaming treatment and manufactures a solid-medium raw material for fermentation is provided.

[0008]In a raw material for which this invention added 0 to 100% of the weight of gluten again to wheat flour of 1 to 4 % of the weight of ash, or this. Water is added, water content at the time of a granulation is adjusted to 12 to 18% of the weight of a range, and is corned, and the 2nd invention that grinds after carrying out steaming treatment subsequently, and manufactures a liquid-medium raw material for fermentation is provided.

[0009]

[Embodiment of the Invention]Although a wheat bran independent may be sufficient as the raw material used when manufacturing the solid-medium raw material for fermentation of the 1st invention, wheat flour can also be used together to this. If it is preferred that it is below 50% of the weight of wheat bran (% shows hereafter unless it refuses) as for wheat flour and it blends exceeding this in using wheat flour together, The pellet surface acquired is sticky, both pellets adhere easily, and workability gets worse, and the problem of causing decline in the yield of a fermentation product is produced. Especially when manufacturing the liquid-medium raw material for fermentation of the 2nd invention, it is preferred that an ash content uses the wheat flour which is 1 to 3% 1 to 4% as a raw material. Gluten can be blended again in order to adjust carbon / nitrogen ratio (C/N ratio) to this raw material depending on the kind of fermentation micro organism. the loadings of gluten -- the raw material whole quantity -- 10 to 70% is especially preferred 100% or less.

[0010]It adjusts so that water or a steam may be added to the above-mentioned raw material and water content may be 12 to 18%. Although the above-mentioned raw material changes also with the kinds, generally it contains 10 to 15% of moisture. However, when a raw material contains not less than 12% of moisture, it is required to add 2 to 6% of water or a steam, and to consider it as a mentioned range. If a granulation cannot be well performed as the water content at the time of a granulation is important and water content is less than 12%, and it exceeds 18%, will form a pellet and workability will worsen, and in the steaming treatment performed to the next, albuminoid degeneration is not fully performed.

[0011]The granulation of the raw material whose humidity was controlled is carried out. As for a granulation, it is preferred to be specific gravity 0.4-0.6 and to mold in a size about 2-10 mm in diameter using the usual granulators, such as a pellet mill.

[0012]Subsequently, steaming treatment of this granulation thing is carried out. Steaming treatment is preferably performed for 2 to 10 minutes for more than 2 minutes under the application of pressure of 1 - 2 kg/cm<sup>2</sup> under the application of pressure more than gage pressure 1.0 kg/cm<sup>2</sup>. Since a granulation thing plumps and it becomes porosity by this steaming treatment, and the protein in a raw material denaturalizes and starch is pregelatinized, a microorganism can be used as a fermentative raw material as it is.

[0013]Thus, as for the obtained steaming treatment thing, grinding and using is preferred, after [ that ] drying so that a moisture content may be 15% or less preferably although it may use as a solid medium for fermentation again. And after this solid-medium raw material for fermentation includes the solution containing water or various nutritional information at the time of use so that a moisture content may be 35 to 80% preferably, it can be cultivated by inoculating a fermentation micro organism.

[0014]If it is suspended in water after grinding a steaming treatment thing, the liquid medium for fermentation which can prepare soluble starch easily can be obtained.

[0015]If the bacillus belonging to an Aspergillus or the Trichoderma is inoculated into the solid medium for

fermentation or liquid medium obtained by this invention and it cultivates with a conventional method to it, various enzymes can produce efficiently, and if the substrate of the enzyme concerned is made to exist, various fermentation products are efficiently producible.

[0016]

[Effect of the Invention]The solid medium obtained from the solid-medium raw material for fermentation obtained by this invention method, Breathability is good, and since porous structure is formed strongly, in order that a zymogen may grow good, it excels in the productivity of the fermentation product, and it has the effect that a fermentation product can be acquired with high yield, without destroying porous structure, even if it moreover teaches so much and performs deposition culture. The liquid medium obtained from the liquid-medium raw material for fermentation can skip the process of gelatinization, and soluble starch can be prepared at low temperature, and since the protein in a raw material is prepared by easy-digestibility, it is easily used by a fermentation micro organism, and it has the feature that the separation refinement of the quality of an object is easy.

[0017]

[Example]Next, an example is given and described.

The pellet of the water content of 17.5% and 4 mm in diameter a cylindrical shape was prepared in the pellet mill, blowing a steam into 500 kg of careful selection wheat bran (5.0% of ash, Nisshin Flour Milling make) of example 1 marketing. After carrying out steaming treatment of this pellet for 10 minutes with the application-of-pressure saturated vapor of gage pressure 1 kg/cm<sup>2</sup>, it dried and moisture was adjusted to 13.5%.

[0018]The pellet of the water content of 12.1% and 4 mm in diameter a cylindrical shape was prepared in the pellet mill, blowing a steam into what added 100 kg of vital gluten powder to 500 kg of careful selection wheat bran (5.0% of ash) of example 2 marketing, and was fully mixed. After carrying out steaming treatment of this pellet for 2 minutes with the application-of-pressure saturated vapor of gage pressure 2 kg/cm<sup>2</sup>, it dried and moisture was adjusted to 13.3%.

[0019]The pellet of the water content of 14.0% and 4 mm in diameter a cylindrical shape was prepared in the pellet mill, blowing a steam into what added 50 kg of wheat flour (a red flower, 2.7% of ash, Nisshin Flour Milling make) to 500 kg of careful selection wheat bran (5.0% of ash) of example 3 marketing. After carrying out application-of-pressure steaming treatment of this pellet for 10 minutes with the application-of-pressure saturated vapor of gage pressure 1 kg/cm<sup>2</sup>, it dried and moisture was adjusted to 13.2%.

[0020]The pellet of the water content of 17.0% and 4 mm in diameter a cylindrical shape was prepared in the pellet mill, blowing a steam into 500 kg of careful selection wheat bran (5.0% of ash) of example 4 marketing, 50 kg of wheat flour (a red flower, 2.7% of ash, Nisshin Flour Milling make), and the mixture of 100 kg of vital gluten. After carrying out steaming treatment of this pellet for 2 minutes with the application-of-pressure saturated vapor of gage pressure 2 kg/cm<sup>2</sup>, it dried and moisture was adjusted to 13.3%.

[0021]The pellet of the water content of 14.5% and 4 mm in diameter a cylindrical shape was prepared in the pellet mill, blowing a steam into what added 50 kg of wheat flour (0.4% of jar rear ash Nisshin Flour Milling make) to 500 kg of careful selection wheat bran (5.0% of ash) of example 5 marketing, and was fully mixed. After carrying out steaming treatment of this pellet for 5 minutes with the application-of-pressure maximum vapor tension of gage pressure 1 kg/cm<sup>2</sup>, it dried and moisture was adjusted to 13.5%.

[0022]Refining wheat bran (5.0% of ash) of comparative example 1 marketing was made into the culture medium as it was.

[0023]According to the example of a statement, it carried out to comparative example 2 JP,4-4866,B as follows. That is, to 50 kg of commercial careful selection wheat bran (5.0% of ash), 7.5 kg of wheat flour (a red flower, 2.7% of ash, Nisshin Flour Milling make) was mixed, and addition mixing of 40 l. of the water was carried out further at this. After making this mixture into a 7phix30mm pellet with an extrusion machine, artificial drying was carried out by about 70 \*\* warm air, and the moisture of the pellet was adjusted to about 8.5%.

[0024]It prepared at a time three Erlenmeyer flasks of 200-ml \*\* which put in 10 g of culture media (sample) of example of examination 1 Examples 1-5, and the comparative examples 1-2, respectively, and it added water so that each moisture content might be 50%. Next, after carrying out sterilization treatment for 20 minutes at 121 \*\* using autoclave, it cooled radiationally and sample temperature was lowered to 30 \*\* or less. Then, 1 ml of seed malt fungus liquid which was suspended in water in commercial seed malt (it is round fortune the seed malt M-1, Japan

brewing industry incorporated company), and adjusted concentration to 500 ppm was inoculated into the sample, and standing culture was performed for three days at 30 \*\*. 10 g of things which ground this lightly by the mixer, and 100 ml of pure water were put into a 200-ml beaker after culture, and the enzyme was extracted over 2 hours at 4 \*\*. Next, after centrifuging this extract for 10 minutes at 3000 rpm, supernatant liquid was filtered through the filter paper and filtrate was used as crude enzyme liquid.

[0025] 0.1 ml of this crude enzyme liquid was added to 4 ml of pure water, and it was kept warm for 5 minutes at 37 \*\*. After adding the tablet of the neo amylase test (made by Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) to this one grain and stirring violently, the enzyme reaction was performed for 30 minutes at 37 \*\*. After adding NaOH 1ml of 0.5N 30 minutes afterward and stopping a reaction, it centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm, and amylase activities were calculated from the absorption at 620 nm of supernatant liquid except for the insoluble substrate. The result is as being shown in Table 1. Amylase activities measured 3 times of average value, and showed it in relative activity when the comparative example 1 was set to 100.

[0026]

[Table 1]

培 地	アミラーゼ活性 (%)
実施例 1	130
実施例 2	135
実施例 3	142
実施例 4	145
実施例 5	140
比較例 1	100
比較例 2	130

[0027] It added water so that a moisture content might all be every 50% to 1 kg of the example of examination 2 aforementioned samples. 0.5% of the seed fungus could be added to this, and it mixed, and ventilation culture was taught and carried out for three days so that it might become a thickness of 30 cm to a koji-making machine. 10 g of cultivated samples and 100 ml of pure water were put into a 200-ml beaker after culture, and the enzyme was extracted over 2 hours at 4 \*\*. This extract was centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm, supernatant liquid was filtered through the filter paper, and filtrate was used as crude enzyme liquid.

[0028] 1 ml of milk casein solutions and 1 ml of distilled water were taken in the test tube 1.5%, and it was kept warm for 5 minutes at 30 \*\*. After adding 1 ml of crude enzyme liquid to this and making it react for 10 minutes at 30 \*\*, 3 ml of trichloroacetic acid solutions of 0.4M were added, and the reaction was stopped. filter out the precipitate which was neglected for 30 minutes and formed at 30 \*\*, and 5 ml of 0.55M sodium carbonate solutions follow 2 ml of filtrate -- 1 ml of Folin reagents of 3 time dilution -- in addition, after neglecting it for 30 minutes at 30 \*\*, protease activity was calculated from the absorbance of 660 nm. The result is as being shown in Table 2. Relative activity when the comparative example 1 was set to 100 showed protease activity. Amylase activities as well as the example 1 of an examination were measured, and it was shown in Table 2.

[0029]

[Table 2]

培 地	アミラーゼ活性 (%)	プロテアーゼ活性 (%)
実施例 1	1 5 8	1 3 7
実施例 2	1 5 0	1 5 1
実施例 3	1 6 5	1 4 0
実施例 4	1 6 0	1 5 5
実施例 5	1 6 0	1 4 5
比較例 1	1 0 0	1 0 0
比較例 2	1 2 2	1 1 5

[0030]The culture medium of Examples 1-5 went up 37 to 55% by protease activity 50 to 65% by amylase activities compared with the culture medium of the comparative example 1 so that clearly from Table 2. Although it was going up a little when as for the culture medium of the comparative example 2 the lower pellet was crushed during culture, growth of the bacillus worsened and enzyme activity was compared with the culture medium of the comparative example 1, compared with the culture medium of Examples 1-5, the rate of increase was below half.

[0031]The pellet of the water content of 17.7% and 4 mm in diameter a cylindrical shape was prepared in the pellet mill, blowing a steam into 500 kg of example 6 wheat flour (a red flower, 2.7% of ash, Nisshin Flour Milling make). After carrying out steaming treatment of this pellet for 10 minutes with the application of pressure saturated vapor of gage pressure 1 kg/cm<sup>2</sup>, it dried, and moisture was adjusted to 14.5%, then this was ground, and the particle size was arranged with 70 or less meshes.

[0032]The pellet of the water content of 12.5% and 6 mm in diameter a cylindrical shape was prepared in the pellet mill, blowing a steam into what added 100 kg of vital gluten powder to 500 kg of example 7 wheat flour (a ginkgo nut, 1.2% of ash, Nisshin Flour Milling make), and was fully mixed. After carrying out steaming treatment of this pellet for 10 minutes with the application of pressure saturated vapor of gage pressure 1 kg/cm<sup>2</sup>, it dried, and moisture was adjusted to 13.5%, then this was ground, and the particle size was arranged with 50 or less meshes.

[0033]The pellet of the water content of 15.0% and 4 mm in diameter a cylindrical shape was prepared in the pellet mill, blowing a steam into what added 200 kg of vital gluten powder to 500 kg of example 8 wheat flour (\*\*\*\*, 3.7% of ash, Nisshin Flour Milling make), and was fully mixed. After carrying out steaming treatment of this pellet for 5 minutes with the application of pressure maximum vapor tension of gage pressure 1 kg/cm<sup>2</sup>, it dried, and moisture was adjusted to 14.0%, then this was ground, and the particle size was arranged with 70 or less meshes.

[0034]The pellet of the water content of 14.5% and 4 mm in diameter a cylindrical shape was prepared in the pellet mill, blowing a steam into what added 500 kg of vital gluten powder to 500 kg of example 9 wheat flour (a red flower, 1.2% of ash Nisshin Flour Milling make), and was fully mixed. After carrying out steaming treatment of this pellet for 5 minutes with the application of pressure maximum vapor tension of gage pressure 1 kg/cm<sup>2</sup>, it dried, and moisture was adjusted to 14.2%, then this was ground, and the particle size was arranged with 60 or less meshes.

[0035]The wheat flour of comparative example 3 Example 6 was made into the culture medium as it was.

[0036]The cornstarch of comparative example 4 marketing was made into the culture medium as it was.

[0037]It was suspended to 200 ml of phosphoric acid buffers (pH 6.0) of 20mM, and 20 g of example of examination 3 samples were kept warm for 5 minutes at 40 \*\*. 100 mg of amylase pharmaceutical preparation (Termamyl) was added to this, the reaction was performed for 12 hours, it sampled suitably, the starch of fusibility was measured with the phenol-sulfuric acid method, and cracking severity was calculated according to the following formula. The result was shown in Table 3.

Cracking severity = soluble starch / total sugar x100 (%)

[0038]

[Table 3]

反応時間 (時)	分解率 (%)					
	実施例 6	実施例 7	実施例 8	実施例 9	比較例 3	比較例 4
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	19.8	22.9	20.0	19.5	19.7	1.5
2	32.6	34.4	31.2	30.5	20.2	2.9
4	52.9	51.5	51.6	51.4	32.4	4.0
8	76.8	75.1	75.8	74.9	45.7	5.1
12	90.1	89.0	90.3	89.4	52.7	6.1

[0039] Compared with that to which the culture medium suspended in water in the steaming treatment thing obtained in Examples 6-9 was suspended in water in the culture medium of the comparative examples 3 and 4, generation of high soluble starch is accepted so that clearly from Table 3.

[0040] After adding 20 ml of phosphoric acid buffers (pH 7.2) of 50mM to 2 g of example of examination 4 samples and also adding 40 ml and 5 ml of toluene for 5% of Takadiastase one by one, the reaction was performed for seven days at 37 \*\*. After the reaction, it filtered through the filter paper of NO2 to 100 ml with distilled water, and test liquid was prepared. Then, after heating exam liquid for 3 minutes at 90 \*\*, it quenched and the turbidity of the diluent was measured with the turbidity meter (made by an optical company precision [ Japanese ]) 6 times. The result was shown in Table 4.

[0041]

[Table 4]

濁度 (ppm)	実施例 6	実施例 7	実施例 8	実施例 9	比較例 3
	0.0	0.0	0.0	0.0	385.0

[0042] It is clearer than Table 4 that it of the comparative example 1 is not thoroughly decomposed to the protein in the steaming treatment thing obtained in Examples 6-9 being thoroughly decomposed by the enzyme.

[0043] The lech type grinder ground the pellet prepared in example of examination 5 Examples 1-5, and the sample of this grinding thing and the comparative examples 1 and 2 was made into the test sample. After putting 10 g of test samples into the 200ml Erlenmeyer flask first and carrying out sterilization treatment of this for 20 minutes at 121 \*\* using autoclave, sterilized water was added and moisture was adjusted to 50%. Then, a cork borer 1 cm in diameter inoculated into \*\*\*\* omission and the two above-mentioned culture media at a time the Trichoderma viride bacillus (IFO-31137) which was ordered from IFO and made to spore-ize on a PDA culture medium, and it cultivated for four days at 30 \*\*. The thing 10g and 50 ml of pure water which ground this lightly by the mixer were put into a 100-ml beaker after culture, and the enzyme was extracted over 2 hours at 4 \*\*. Next, after centrifuging this extract for 10 minutes at 3000 rpm, supernatant liquid was filtered through the filter paper and filtrate was used as crude enzyme liquid. next, 0.1 ml of this crude enzyme liquid after taking 1% of CMC solutions [ 4 ml of ] (pH 5) in a test tube and keeping it warm for 5 minutes at 37 \*\* -- in addition, the enzyme reaction was performed at 37 \*\* for 1 hour. The amount of reducing sugar which extracted 0.1 ml of reaction mixture and was generated with Somogyi-Nelson method was measured after the reaction, and CMC ase activity was computed. CMC ase activity measured 3 times of average value, and showed it in relative activity when the comparative example 1 was set to 100. The result was shown in Table 5.

[0044]

[Table 5]

培 地	CMCアーゼ活性 (%)
実施例 1	117
実施例 2	129
実施例 3	115
実施例 4	130
実施例 5	115
比較例 1	100
比較例 2	106

[0045] From Table 5, when the culture medium obtained in Examples 1-5 was used, the productivity of CMC ase was improving compared with the case where the culture medium of the comparative examples 1 and 2 is used.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-173052

(43) 公開日 平成9年(1997)7月8日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

C 1 2 N 1/14

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 N 1/14

技術表示箇所

C

H

1 0 1

1 0 1

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平8-76450

(22) 出願日 平成8年(1996)3月29日

(31) 優先権主張番号 特願平7-175709

(32) 優先日 平7(1995)7月12日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平7-278757

(32) 優先日 平7(1995)10月26日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000226998

日清製粉株式会社

東京都中央区日本橋小網町19番12号

(72) 発明者 山田 英明

茨城県つくば市大久保13番地 日清製粉株式会社つくば研究所内

(72) 発明者 宮崎 英二

茨城県つくば市大久保13番地 日清製粉株式会社つくば研究所内

(72) 発明者 長田 貞男

茨城県つくば市大久保13番地 日清製粉株式会社つくば研究所内

(74) 代理人 弁理士 有賀 三幸 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発酵用培地原料の製造法

(57) 【要約】

【解決手段】 小麦フスマまたは小麦フスマと小麦粉の混合物、あるいはこれらに対し0～40重量%のグルテンを添加した原料に、水を加えて造粒時の含水率を12～18重量%の範囲に調整して造粒し、次いで蒸熱処理して発酵用固体培地原料を製造する方法、及び灰分1～4重量%の小麦粉、あるいはこれに対し0～100重量%のグルテンを添加した原料を同様にして蒸熱処理した後粉砕して発酵用液体培地原料を製造する方法。

【効果】 本発明方法によって得られる発酵用固体培地原料より得られる固体培地は、通気性がよく、発酵菌が良好に生育するため、発酵生産物の生産性に優れており、しかも多量に仕込んで堆積培養を行っても、多孔質構造が破壊されることなく、高収率で発酵生産物を得ることができるという特長を有し、また発酵用液体培地原料から得られる液体培地は可溶性澱粉を容易に調製できるという特長を有する。



(2)

特開平9-173052

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 小麦フスマまたは小麦フスマと小麦粉の混合物、あるいはこれらに対し0～40重量%のグルテンを添加した原料に、水を加えて造粒時の含水率を12～18重量%の範囲に調整して造粒し、次いで蒸熱処理することを特徴とする発酵用固体培地原料の製造法。

【請求項2】 灰分1～4重量%の小麦粉、あるいはこれに対し0～100重量%のグルテンを添加した原料に、水を加えて造粒時の含水率を12～18重量%の範囲に調整して造粒し、次いで蒸熱処理した後粉碎することを特徴とする発酵用液体培地原料の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、工業用酵素、抗生物質などの生理活性物質やアミノ酸等を製造する際に用いられる発酵用培地原料の製造法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、固体培養法による有用な発酵生産物の製造法としては、バット、麹ふた等に澱粉粕、米糠等の発酵原料を薄層になるように広げて菌を接種し、培養を行う方法（特公昭37-6341号、特公昭41-16555号、特公昭40-6396号、特公昭43-20708号）、また澱粉粕などの発酵原料を積み上げて発酵を行う堆積培養法（特公昭29-4196号、特公昭37-5397号）などが知られている。しかし、前者は培養に床面積を必要とするという欠点を有しており、また後者は、発酵中自重により沈下するために空気の流通が悪くなり、温度が上昇して目的発酵生産物の収率の低下をきたすという問題点があった。

【0003】また、最近、小麦フスマに適当量の澱粉と水を混合したものを多孔質のペレットに成形した培地が報告されている（特公平4-4866号）。しかし、この培地は、小麦フスマに対して80%の水を加えた後に造粒を行うものであるため、造粒後の乾燥に時間とコストがかかるという欠点があると共に、この培地を用いて堆積培養を行うと、ペレット中の多孔質構造の孔が自重でつぶれて通気性が悪くなり、菌の生育が低下して、発酵生産物の生産性が悪くなるという問題点があった。

【0004】更にまた、液体培養法によって有用微生物を培養する場合、炭素源としてブドウ糖やショ糖、糖蜜等が使用されるが、放線菌や糸状菌の培養には可溶性澱粉が用いられることも多い。しかし、可溶性澱粉を調製するには、澱粉を糊化した後、アミラーゼや酸を用いてこれを限定的に加水分解しなければならないが、どちらの場合も澱粉を糊化するという工程が必要であるという欠点があった。また、窒素源として大豆粉を添加することもあるが、添加蛋白が発酵終期まで残ると目的とする酵素蛋白などとの分離が困難になるという欠点があった。

## 【0005】

2

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は、発酵生産物の生産性に優れ、その収率を低下させることなく仕込量を増加させることができ、かつ容易に可溶性澱粉を調製でき、更に培地中から発酵生産物を簡単な操作で分離・精製することができる発酵用培地を調製することのできる培地原料を提供することを目的とするものである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者は、上記課題を解決せんと鋭意研究を行った結果、本発明を完成した。

【0007】すなわち、本発明は、小麦フスマまたは小麦フスマと小麦粉の混合物、あるいはこれらに対し0～40重量%のグルテンを添加した原料に、水を加えて造粒時の含水率を12～18重量%の範囲に調整して造粒し、次いで蒸熱処理して発酵用固体培地原料を製造する第1の発明を提供するものである。

【0008】更にまた、本発明は、灰分1～4重量%の小麦粉、あるいはこれに対し0～100重量%のグルテンを添加した原料に、水を加えて造粒時の含水率を12～18重量%の範囲に調整して造粒し、次いで蒸熱処理した後粉碎して発酵用液体培地原料を製造する第2の発明を提供するものである。

## 【0009】

【発明の実施の形態】第1の発明の発酵用固体培地原料を製造する際に使用される原料は小麦フスマ単独でもよいが、これに小麦粉を併用することもできる。小麦粉を併用する場合には、小麦粉は小麦フスマの50重量%

（以下、ことわらない限り%で示す）以下であるのが好ましく、これを超えて配合すると、得られるペレット表面がべとついてペレット相互が付着しやすくなって作業性が悪化し、また発酵生産物の収率の低下をきたすという問題を生ずる。また、第2の発明の発酵用液体培地原料を製造する場合には、原料として灰分含量が1～4%、特に1～3%である小麦粉を用いるのが好ましい。更にまた、この原料に、発酵微生物の種類によっては、炭素／窒素比（C/N比）を調整する目的でグルテンを配合することができる。グルテンの配合量は原料全量の100%以下、特に10～70%が好ましい。

【0010】上記原料に水または水蒸気を加えて含水率が12～18%になるように調整する。上記原料は、その種類によっても異なるが、一般に10～15%の水分を含有する。しかし、原料が12%以上の水分を含有する場合においても、更に2～6%の水または水蒸気を添加して上記範囲とすることが必要である。造粒時の含水率は重要であり、含水率が12%未満であると造粒をうまく行うことができず、また18%を超えるとダマを形成して作業性が悪くなると共に、次に行う蒸熱処理において蛋白変性が充分に行われぬ。

【0011】調湿された原料は造粒される。造粒はペレ

(3)

特開平9-173052

3

ットミル等の通常の造粒機を用いて、比重0.4~0.6で、直径2~10mm程度の大きさに成型するのが好ましい。

【0012】次いで、この造粒物は蒸熱処理される。蒸熱処理は、ゲージ圧1.0kg/cm<sup>2</sup>以上の加圧下、好ましくは1~2kg/cm<sup>2</sup>の加圧下で、2分間以上、好ましくは2~10分間行われる。この蒸熱処理によって、造粒物が膨化して多孔質となると共に、原料中の蛋白質は変性され、また澱粉はα化されるので、そのまま発酵原料として微生物が利用することができる。

【0013】このようにして得られた蒸熱処理物はそのまた発酵用固体培地として用いてもよいが、好ましくは水分含量が15%以下になるように乾燥した後、粉碎して用いるのが好ましい。そして、この発酵用固体培地原料は、使用時、水または種々の栄養成分を含有する水溶液を、好ましくは水分含量が35~80%になるように含ませた後、発酵微生物を接種し、培養を行うことができる。

【0014】また、蒸熱処理物を粉碎した後、水に懸濁すれば、容易に可溶性澱粉を調製できる発酵用液体培地を得ることができる。

【0015】本発明によって得られる発酵用固体培地または液体培地に、アスペルギルス属やトリコデルマ属に属する菌を接種し、常法により培養を行えば種々の酵素が効率よく生産でき、また当該酵素の基質を存在せしめれば種々の発酵生産物を効率よく生産することができる。

【0016】

【発明の効果】本発明方法によって得られる発酵用固体培地原料から得られる固体培地は、多孔質構造が強く形成されているので、通気性がよく、発酵菌が良好に生育するため、発酵生産物の生産性に優れており、しかも多量に仕込んで堆積培養を行っても、多孔質構造が破壊されることなく、高収率で発酵生産物を得ることができるという効果を有する。また、発酵用液体培地原料から得られる液体培地は、糊化の工程を省略し、低温で可溶性澱粉を調製することができると共に、原料中の蛋白は易消化性に調製されているので容易に発酵微生物によって利用され、目的物質の分離精製が容易であるという特長を有する。

【0017】

【実施例】次に実施例を挙げて説明する。

実施例1

市販の精選小麦フスマ(灰分5.0%、日清製粉製)500kgに蒸気を吹き込みながらペレットミルにて含水率17.5%、直径4mmの円筒形のペレットを調製した。このペレットをゲージ圧1kg/cm<sup>2</sup>の加圧飽和蒸気にて10分間蒸熱処理した後、乾燥して水分を13.5%に調整した。

【0018】実施例2

4

市販の精選小麦フスマ(灰分5.0%)500kgにバイタルグルテン粉末100kgを加えて十分にミキシングしたものに、蒸気を吹き込みながらペレットミルにて含水率12.1%、直径4mmの円筒形のペレットを調製した。このペレットをゲージ圧2kg/cm<sup>2</sup>の加圧飽和蒸気にて2分間蒸熱処理した後、乾燥して水分を13.3%に調整した。

【0019】実施例3

市販の精選小麦フスマ(灰分5.0%)500kgに小麦粉(赤花、灰分2.7%、日清製粉製)50kgを添加したものに、蒸気を吹き込みながらペレットミルにて含水率14.0%、直径4mmの円筒形のペレットを調製した。このペレットをゲージ圧1kg/cm<sup>2</sup>の加圧飽和蒸気にて10分間加圧蒸熱処理した後、乾燥して水分を13.2%に調整した。

【0020】実施例4

市販の精選小麦フスマ(灰分5.0%)500kg、小麦粉(赤花、灰分2.7%、日清製粉製)50kg、バイタルグルテン100kgの混合物に、蒸気を吹き込みながらペレットミルにて含水率17.0%、直径4mmの円筒形のペレットを調製した。このペレットをゲージ圧2kg/cm<sup>2</sup>の加圧飽和蒸気にて2分間蒸熱処理した後、乾燥して水分を13.3%に調整した。

【0021】実施例5

市販の精選小麦フスマ(灰分5.0%)500kgに小麦粉(カメリア灰分0.4%、日清製粉製)50kgを加えて十分にミキシングしたものに蒸気を吹き込みながらペレットミルにて含水率14.5%、直径4mmの円筒形のペレットを調製した。このペレットをゲージ圧1kg/cm<sup>2</sup>の加圧飽和蒸気圧にて5分間蒸熱処理した後、乾燥して水分を13.5%に調整した。

【0022】比較例1

市販の精製小麦フスマ(灰分5.0%)をそのまま培地とした。

【0023】比較例2

特公平4-4866号に記載の実施例に準じて以下のように行った。すなわち、市販の精選小麦フスマ(灰分5.0%)50kgに対し、小麦粉(赤花、灰分2.7%、日清製粉製)7.5kgを混合し、これに更に水40リットルを添加混合した。この混合物を押出機にて7φ×30mmのペレットにした後、約70℃の温風で強制乾燥させ、ペレットの水分を約8.5%に調整した。

【0024】試験例1

実施例1~5及び比較例1~2の培地(サンプル)10gを入れた200ml容の三角フラスコをそれぞれ3点ずつ用意し、水分含量がいずれも50%になるように加水した。次に、オートクレーブを用いて121℃で、20分間滅菌処理した後、放冷してサンプル温度を30℃以下に下げた。続いて、市販の種麴(丸福種麴M-1、日本醸造工業株式会社)を水に懸濁して濃度を500ppm

(4)

特開平9-173052

5

6

に調整した種麹菌液1mlをサンプルに接種し、30℃で3日間静置培養を行った。培養後、これをミキサーで軽く粉碎したもの10gと純水100mlを200mlのビーカーにいれ、4℃で2時間にわたって酵素の抽出を行った。次に、この抽出液を3000rpmで10分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙で濾過して濾液を粗酵素液とした。

【0025】この粗酵素液0.1mlを純水4mlに加え、37℃で5分間保温した。これにネオアマラーゼテスト（第一化学薬品社製）の錠剤を1粒加えて激しく攪拌した後、37℃で30分間酵素反応を行った。30分後に0.5NのNaOH 1mlを加えて反応を止めた後、3000rpmで10分間遠心分離して不溶性の基質を除き、上澄み液の620nmにおける吸収からアマラーゼ活性を計算した。その結果は表1に示すとおりである。なお、アマラーゼ活性は3回の平均値を測定し、比較例1を100としたときの相対活性で示した。

【0026】

【表1】

培地	アマラーゼ活性(%)
実施例1	130
実施例2	135
実施例3	142
実施例4	145
実施例5	140
比較例1	100
比較例2	130

\*30

培地	アマラーゼ活性(%)	プロテアーゼ活性(%)
実施例1	158	137
実施例2	150	151
実施例3	165	140
実施例4	160	155
実施例5	160	145
比較例1	100	100
比較例2	122	115

【0030】表2から明らかなように、実施例1～5の培地は比較例1の培地に比べて、アマラーゼ活性で50～65%、プロテアーゼ活性で37～55%上昇した。比較例2の培地は培養中に下部のペレットがつぶれて菌の生育が悪くなり、酵素活性は比較例1の培地に比べれば若干上昇していたものの、実施例1～5の培地に比べるとその増加率は半分以下であった。

【0031】実施例6

小麦粉（赤花、灰分2.7%、日清製粉製）500kgに

\*【0027】試験例2

前記サンプル各1kgに、いずれも水分含量が50%になるように加水した。これに種菌0.5%を添加してよく混合し、製麹機に30cmの厚さになるように仕込み、3日間通風培養した。培養後、培養サンプル10gと純水100mlを200mlのビーカーにいれ、4℃で2時間にわたって酵素の抽出を行った。この抽出液を3000rpmで10分間遠心分離し、上澄み液をろ紙で濾過して濾液を粗酵素液とした。

【0028】1.5%ミルクカゼイン溶液1mlと蒸留水1mlを試験管にとり、30℃で5分間保温した。これに粗酵素液1mlを加え、30℃で10分間反応させた後、0.4Mのトリクロル酢酸溶液3mlを加えて反応を停止させた。30℃で30分間放置して生じた沈殿を濾去し、濾液2mlに0.55M炭酸ナトリウム溶液5ml、続いて3倍希釈のFolin試薬1mlを加えて、30℃で30分間放置した後、660nmの吸光度からプロテアーゼ活性を計算した。その結果は表2に示すとおりである。なおプロテアーゼ活性は比較例1を100としたときの相対活性で示した。また、試験例1と同様にしてアマラーゼ活性を測定し、表2に示した。

【0029】

【表2】

蒸気を吹き込みながらペレットミルにて含水率17.7%、直径4mmの円筒形のペレットを調製した。このペレットをゲージ圧1kg/cm<sup>2</sup>の加圧飽和蒸気にて10分間蒸熱処理した後、乾燥して水分を14.5%に調整し、続いて、これを粉碎して粒度を70メッシュ以下にそろえた。

【0032】実施例7

小麦粉（銀杏、灰分1.2%、日清製粉製）500kgにバイタルグルテン粉末100kgを加えて十分にミキシン

(5)

特開平9-173052

7

8

グしたものに蒸気を吹き込みながらペレットミルにて含水率12.5%、直径6mmの円筒形のペレットを調製した。このペレットをゲージ圧1kg/cm<sup>2</sup>の加圧飽和蒸気にて10分間蒸熱処理した後、乾燥して水分を13.5%に調整し、続いて、これを粉砕して粒度を50メッシュ以下にそろえた。

## 【0033】実施例8

小麦粉(黄亀、灰分3.7%、日清製粉製)500kgにバイタルグルテン粉末200kgを加えて十分にミキシングしたものに蒸気を吹き込みながらペレットミルにて含水率15.0%、直径4mmの円筒形のペレットを調製した。このペレットをゲージ圧1kg/cm<sup>2</sup>の加圧飽和蒸気圧にて5分間蒸熱処理した後、乾燥して水分を14.0%に調整し、続いて、これを粉砕して粒度を70メッシュ以下にそろえた。

## 【0034】実施例9

小麦粉(赤花、灰分1.2%日清製粉製)500kgにバイタルグルテン粉末500kgを加えて十分にミキシングしたものに蒸気を吹き込みながらペレットミルにて含水\*

\*率14.5%、直径4mmの円筒形のペレットを調製した。このペレットをゲージ圧1kg/cm<sup>2</sup>の加圧飽和蒸気圧にて5分間蒸熱処理した後、乾燥して水分を14.2%に調整し、続いて、これを粉砕して粒度を60メッシュ以下にそろえた。

## 【0035】比較例3

実施例6の小麦粉をそのまま培地とした。

## 【0036】比較例4

市販のコーンスターチをそのまま培地とした。

## 【0037】試験例3

サンプル20gを20mMのリン酸バッファー(pH6.0)200mlに懸濁し、40℃に5分間保温した。これにアミラーゼ製剤(ターマミル)を100mg加えて12時間反応を行い、適宜サンプリングして可溶性の澱粉をフェノール硫酸法で測定し、次式に従って分解率を計算した。結果を表3に示した。

分解率=可溶性澱粉/全糖量×100(%)

## 【0038】

## 【表3】

反応時間 (時)	分解率(%)					
	実施例6	実施例7	実施例8	実施例9	比較例3	比較例4
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	19.8	22.9	20.0	19.5	19.7	1.5
2	32.6	34.4	31.2	30.5	20.2	2.9
4	52.9	51.5	51.6	51.4	32.4	4.0
8	76.8	75.1	75.8	74.9	45.7	5.1
12	90.1	89.0	90.3	89.4	52.7	6.1

【0039】表3から明らかなように、実施例6～9で得られた蒸熱処理物を水に懸濁した培地は、比較例3及び4の培地を水に懸濁したものに比べ高い可溶性澱粉の生成が認められる。

## 【0040】試験例4

サンプル2gに50mMのリン酸バッファー(pH7.2)を20ml加え、更に5%のタカジアスターゼを40ml、トルエンを5ml順次加えた後、37℃で7日間反応を行※

※った。反応後、蒸留水で100mlにNO<sub>2</sub>の濾紙で濾過して試験液を調製した。続いて、本試験液を90℃で3分間加熱した後、急冷し、6倍希釈液の濁度を濁度計(日本精密光学社製)で測定した。結果は表4に示した。

## 【0041】

## 【表4】

濁度 (ppm)	実施例6	実施例7	実施例8	実施例9	比較例3
	0.0	0.0	0.0	0.0	385.0

【0042】表4より、実施例6～9で得られた蒸熱処理物中の蛋白質は酵素によって完全に分解されているのに対し、比較例1のそれは完全に分解されていないことが明らかである。

## 【0043】試験例5

実施例1～5で調製したペレットをレッチ式粉砕機で粉砕し、この粉砕物と比較例1、2のサンプルを試験サンプルとした。まず試験サンプル10gを200ml容三角

フラスコに入れ、これをオートクレーブを用いて121℃で20分間滅菌処理した後、滅菌水を加えて水分を50%に調整した。続いて、IFOから取り寄せPDA培地上で孢子化させたTrichoderma viride菌(IF0-31137)を直径1cmのコルクボーラーでくり抜き、上記の培地に2個ずつ接種して30℃で4日間培養した。培養後、これをミキサーで軽く粉砕した物10gと純水50mlを100mlのビーカーに入れ、4℃で2時間にわたつ

(6)

特開平9-173052

10

9  
て酵素の抽出を行った。次に、この抽出液を3000rpmで10分間遠心分離した後、上澄み液を濾紙で濾過して、濾液を粗酵素液とした。次に、1%のCMC溶液(pH5)4mlを試験管に採り、37℃で5分間保温した後、この粗酵素液0.1mlを加えて、37℃で1時間酵素反応を行った。反応後、反応液を0.1ml採取しソモギーネルソン法で生成した還元糖量を測定し、CMCアーゼ活性を算出した。尚、CMCアーゼ活性は3回の平均値を測定し、比較例1を100としたときの相対活性で示した。結果は表5に示した。

\*【0045】表5より、実施例1～5で得られた培地を用いた場合は比較例1及び2の培地を用いた場合に比べて、CMCアーゼの生産性が向上していた。

10

【0044】

【表5】

培 地	CMCアーゼ活性(%)
実施例1	117
実施例2	129
実施例3	115
実施例4	130
実施例5	115
比較例1	100
比較例2	106

20

\*

フロントページの続き

(72)発明者 神前 健  
茨城県つくば市大久保13番地 日清製粉株式会社つくば研究所内

(72)発明者 岡田 憲三  
茨城県つくば市大久保13番地 日清製粉株式会社つくば研究所内

(72)発明者 岸 圭一  
東京都中央区日本橋小網町19番12号 日清製粉株式会社内